

Генетика на бронхиалната астма – по дългия път към истината

Д-р Ирен Цочева

Клиника по педиатрия, УМБАЛ „Александровска“

Резюме

Бронхиалната астма е комплексно заболяване, за изявата на което е необходимо взаимодействие между генетични фактори и фактори от околната среда. При съвременните асоциационни проучвания на целия геном и мета-анализи се потвърди значението на известни патофизиологични механизми, но се идентифицираха и гени, характерни само за детската възраст. Предизвикателството пред изследователите сега е чрез функционални изследвания да разкрият механизмите на действие на генетичните вариации.

Ключови думи: *бронхиална астма, генетика, асоциационни проучвания.*

The Genetics of asthma – the long way of discovery

Iren Tzotcheva

Pediatric clinic, University Hospital „Alexandrovska“

Abstract

Asthma is a complex disease, which manifestation involves both genetic and environmental contributions. Recent genome-wide association studies and meta-analyses confirmed the meaning of well-known pathophysiological pathways, but also identified novel gen variations, associated only with risk for childhood onset asthma. The great challenge that the researchers now face is to elucidate the effects of associated variations on gene regulation and function.

Key words: *asthma, genetic, association studies.*

От столетия е известно, че астмата е заболяване с фамилно разпространение. Първоначално количествената оценка на ролята на наследствеността за изява на бронхиална астма (БА) е проучена в засегнати фамилии. По този начин се определя фамилният релативен риск (λR), който представлява съотношение на честотата на дадена характеристика сред роднините на един засегнат индивид към честотата ѝ в общата популация. С R се отбелязва типът на изследваните родственици – братя и сестри, потомци. В различни проучвания стойността на λ варира от 2.5 до 6.⁶ За сравнение, стойностите на λ при муковисцидоза, захарен диабет тип 1 и шизофрения са съответно 500, 15 и 8. Друг метод за изучаване на генетичната

предразположеност към развитието на дадено заболяване е изследването на близнаци. Тъй като еднояйчните близнаци са генетично идентични, а двужайчните в 50%, ако астмата е генетично обусловена, то рискът за еднояйчния близнак на болен от астма ще е по-висок от риска за двужайчен близнак. В този случай ролята на факторите на околната среда ще е еднаква и при еднояйчните, и при двужайчните близнаци. И при фамилните проучвания, и при проучванията с близнаци унаследяването на бронхиалната астма варира от 30% до 70%. Освен на БА чрез тези методи е проучено унаследяването и на т. нар. междинни фенотипи като общи IgE, атопия и бронхиална хиперреактивност (БХР). Степента на унаследяване на общите IgE е най-

висока и достига до 70%, докато за атопията и БХР се движат между 30% и 50%.⁵

Тези проучвания показват, че астмата и атопичните болести са комплексни генетични заболявания, които не се включват в основните Менделови модели на унаследяване (автосомно доминантно, автосомно рецесивно и X-свързано) и се характеризират с:

- ◆ полигенно унаследяване – съчетанието на няколко независими гена е необходимо за фенотипната изява на заболяването;

- ◆ генетична хетерогенност – различни генни варианти, действащи независимо, могат да доведат до еднакъв фенотип.¹⁷

При комплексните заболявания нито отделен ген, нито фактор на средата или на стила на живот самостоятелно не е достатъчен за изява на заболяването. Рискът за индивида в популацията варира в зависимост от съотношението на отделните фактори и точния момент на взаимодействие.

Методите за откриване на гени, свързани с астмата, се развиват през последното десетилетие, паралелно с усъвършенстване на техниките за генотипизиране.

Изследване на „кандидат“ гени

Исторически първият подход, използван при проучване на генетиката на БА от 1970 година насам, е изследването на асоциацията с кандидат-гени за заболяването. Първата стъпка е да се подберат гени „от интерес“ въз основа на хипотезата, че протеинът, кодиран от съответния ген, има съществено значение за патогенезата на заболяването. След това избраният ген се секвенира за установяване на чести мутации, т. нар. полиморфизми.¹⁹ Под полиморфизъм (SNP) се разбира замяна на една база с друга в ДНК веригата. Това е най-простата генетична вариабилност. Човешкият геном съдържа около 10 милиона SNPs. В зависимост от мястото си в кодиращата част на гена или промотора му, полиморфизмът може да повлияе регулацията на генната експресия или да доведе до променен генен продукт. Така установените полиморфизми се изследват за асоциация с астма и/или атопични фенотипи в голяма група болни и контроли.⁷ При бронхиалната астма болшинството от проучваните гени са подбрани въз основа на познанията ни за имунопатогенезата на заболяването, която

от своя страна не е напълно изяснена. За повече от 100 локуса е съобщена асоциация с астма в повече от 1000 публикации само през последните години. Резултатите от така проведените проучвания най-често са разнопосочни или противоречиви. Обикновено първоначално установената асоциация между гаген полиморфизъм и БА не може да бъде потвърдена при изследване на други популации.⁸ Това доведе до изразен критицизм сред научните среди към изследването на генетиката на комплексните заболявания. Слабостите в проучването на кандидат-гени са главно, че изборът на гени се основава на това, което знаем, или по-точно на това, което мислим, че знаем, за патогенезата на заболяването и функцията на гагенния ген. В действителност фактът, че гаген протеин е важен в патофизиологията на заболяването, не означава, че кодиращият го ген има функционално активни полиморфизми. От друга страна, определени имунологични маркери могат да са от значение за поддържане на алергичното възпаление при БА, но да нямам връзка с чувствителността към изява на заболяването. Допълнителни грешки носи изследването на малки групи и непълното обхващане на полиморфизмите на гагенния ген.¹⁹ Методът на проучване на кандидат-гени по своята същност не води до откриване на нови патофизиологични механизми.

Другата група използвани методи при проучването на генетиката на бронхиалната астма се основават на изследване на целия човешки геном. Тези методи се наричат още „свободни от хипотеза“. Най-голямото им предимство е, че чрез тях могат да се открият непознати патофизиологични механизми и гени, свързани с изявата на заболяването. Основен недостатък е нуждата от изследване на много големи групи за получаване на статистически значим резултат. Освен това връзката между идентифицирания локус и патогенезата на заболяването следва да се доизяснява.

Изследвания за скаченост

Първите технически възможни проучвания на целия човешки геном бяха изследванията за скаченост. Изискване за тяхното провеждане е наличието на семейства с най-малко двама засегнати представителя. Срав-

| Ген | Хромозомна локализация | Асоцииран фенотип |
|--|------------------------|----------------------|
| ADAM33 (металопротеиназа 33) | 20p13 | Астма БХР |
| DPP10 (dipeptidил-пептидаза 10) | 2q14 | Астма |
| PHF11 (PHD finger протеин 11) | 13q14 | Астма IgE |
| NPSR1 (рецептор 1 за невропептид S) | 7p14 | Астма IgE |
| HLA-G (човешки левкоцитен антиген G) | 6p21 | Астма БХР, атопия |
| CYFIP2 (цитоплазмен протеин 2, взаимодействащ с FXMR) | 5q33 | Астма |
| IRAC3 (IL-1-рецептор-асоциирана киназа 3) | 12q14 | Астма с ранна изява |
| COL6A5 (колаген тип VI, алфа 6) | 3q21 | Атопичен дерматит |
| OPN3/CHML (опсин 3/choroidermla-like) | 1qter | Астма |

Табл. 1. Астма гени, открити чрез изследвания за скаченост; БХА – бронхиална хиперреактивност

нява се унаследяването на заболяването или астма-свързаните фенотипове (БХР, високи IgE, атопия) с това на определени генетични локуси. Човешкият геном се обхваща чрез сравнително малко на брой (400–800) високо-полиморфни микросателитни маркери, в резултат на което установените региони са много големи и съдържат стотици гени.⁴ Допълнителна трудност идва от факта, че осигуряването на генетичен материал от всички членове на една фамилия е много трудна и скъпоструваща задача. Чрез този метод се откриват по-скоро редки варианти, носещи риск за заболяването, отколкото такива със среден ефект. Между 1996 и 2009 г. са публикувани 25 изследвания за скаченост, чрез които са идентифицирани 9 нови гена, свързани с бронхиалната астма (табл. 1).

Асоциационни проучвания

Същинската революция, наблюдавана в изучаването на генетиката на комплексните заболявания през последните 5 години, стана възможна благодарение на два факта. На първо място бе осъзнато, че е необходимо изследване на огромен брой индивиди. За постигане на тази цел се създаде обединение на 42 изследователски екипа в Европа (наречено

консорциум GABRIEL), с което броят на ДНК-пробите достигна впечатляващите 100 000. Второто основно постижение бе в развитието на технологиите за генотипизиране, позволяващи симултанното изследване на стотици хиляди полиморфизми, разпръснати из целия човешки геном в една ДНК-проба. Това прави възможно изследването на хиляди индивиди седмично. Допълнителен принос има усъвършенстването на статистическите методи за обработка на данните, както и създаването на генетични карти на вариациите на ДНК при различни етнически групи. Тези достижения са в основата на съвременните асоциационни проучвания на целия геном (Genom-wide association studies, GWAS). За разлика от изследванията за скаченост, GWAS са с много голяма чувствителност за установяване на генетични рискови варианти със среден ефект и за тях не е необходимо осигуряването на ДНК-проби от родственици. Основното предимство на GWAS се състои в откриването на неизследвани до момента гени и маханізми, въввлечени в патогенезата на заболяването.

Резултатите от първото GWAS в областта на бронхиалната астма бяха публикувани през 2007 г. само месец след съобщението за възможностите на тези методи при изучаване на генетиката на комплексните заболявания.¹² За да се увеличи статистическата сигнификантност на отделните проучвания, те се окрупняват чрез мета-анализ. В статията на консорциума GABRIEL се обединяват данните от изследване на 582 892 полиморфизми при 10 365 случаи на астма и 16 110 контроли от европейски произход.¹³ Полиморфизми в или близо до следните 6 гена достигат сигнификантна връзка с бронхиалната астма: *HLA-DQ*, *ORMDL3/GSDML*, *IL33*, *IL18R1*, *IL2RB* и *SMAD3*. От голям интерес е асоциацията на локуса 17q21, съдържащ гените *ORMDL3* и *GSDML*, и изявата на астма в детската възраст. От друга страна, асоциацията с *HLA-DQ* е характерна за случаите, когато заболяването се проявява едва при възрастни.

Връзка на локуса 17q21 с детската астма

Асоциацията между полиморфизми в локуса 17q21 и отключването на БА в детска възраст се потвърди и при последвалите

изследвания. Тъй като тези полиморфизми са отговорни за експресията както на гена *ORMDL3* в лимфобластни клетъчни линии, така и на съседния *GSDML* ген, за момента не е възможно да се разграничат ефектите на всеки един. Вариациите в 17q21 локуса показват връзка с бронхиалната астма, но не и с атопични фенотипи, което показва, че в случая трябва да се търси патофизиологичен път, различен от IgE медираните. От друга страна, все още не са напълно установени функциите на *ORMDL3* и *GSDML* гените. Известно е, че гените от фамилията ORM медираат сфинголипидната хомеостаза.¹ Протеинът, кодиран от *ORMDL* гена, се намира в ендоплазматичния ретикулум на много клетъчни линии и вероятно е от значение при стрес реакции.² Чрез създаване на модел с използване на 7 SNPs в локуса на 17q21, може се обясни до 35% от риска за възникване на астма в детска възраст при 75% специфичност. Поради устойчивостта, с която се намира връзката между БА в детска възраст и полиморфизмите на 17q21 при различни етнически групи в отдалечени краища на света, се предполага, че те въздействат върху основен механизъм за развитие на заболяването и ефектът им не е зависим от факторите на околната среда и не се асоциира с алергия.

Асоциация на бронхиална астма с IL33 полиморфизми

При мета-анализ, осъществен от консорциума EVE, при проучвания при различни етнически групи (американци от африкански, европейски и латиноамерикански произход) се установяват асоциации на генните локуси *ORMDL3/GSDML*, *IL33*, *IL18R1*, *TSLP* с бронхиалната астма.¹⁸ IL33 е IL1-подобен цитокин с постоянна експресия в ядрата на епителни и ендотелни клетки. Той активира NF-κB и митоген-активираща протеинкиназа и води до продукция на Th2 цитокини – IL4, IL5, IL13. Счита се, че IL33 може да има роля на „аларма“, сигнализираща имунната система за епителна увреда в резултат на травма или инфекция.¹⁴ Така установените асоциации подчертават ролята на секретирани от бронхиалните епителни клетки цитокини за диференциация и активация на Т-хелпери тип 2 и техните рецептори.

Въпреки че GWAS са от съществено значе-

ние за обогатяване на познанията ни за генетиката на комплексните заболявания, те също имат слабости. По правило редките мутации се игнорират при тези изследвания. Някои от интересните за бронхиалната астма гени не се обхващат от SNPs в използваните чипове – напр. генът за IL4, за който са публикувани асоциации, установени в 17 независими популации. При GWAS се установява ефектът на чести вариации (алелна честота на полиморфизма над 5%) на популационно ниво, докато значението им за индивидуалната чувствителност към заболяване е ограничено.⁹

Проучвания чрез секвениране

Докато GWAS бяха основата на генетичните изследвания на комплексните заболявания през изминалите 5 години, проучванията чрез секвениране ще доминират следващите.²¹ Идеята за тях се базира на хипотезата, че голяма част от генетичния риск за възникване на астмата се крие в редки варианти със сигнификантен ефект, които по правило се пропускат при GWAS. Секвенирането на целия геном на хиляди индивиди е изключително скъпо, затова в момента се проучват отделни гени или целия екзом (сборът от кодиращите участъци от гените). Очакваните в близко бъдеще резултати ще потвърдят или ще отхвърлят хипотезата за значението на редките варианти. Чрез секвениране е възможно да се проучи и ролята на структурните варианти (като броят копия на даден ген), които са широко разпространени.²⁰ Учените се надяват така да се обясни поне част от „липсващата наследственост“ при бронхиалната астма, широко дискутирана през последните години.³

Друг източник на „липсващата наследственост“ е генетичен риск поради ефекти на взаимодействие. Изследванията на взаимодействията ген-ген са изключително трудни. При GWAS с 500 000 SNPs генерираните отношения ще са 250 билиона за тест. Въпреки значителните усилия за разработка на подходяща методология, изследванията на ген-ген взаимодействията са още на начален етап. От друга страна е известно, че взаимодействията ген-фактори на околната среда определят в голяма степен риска от изява на астма или атопия.¹⁵ Прегизвикателство-

мо се състои в това да се установят унифицирани скали, отразяващи експозицията.

Перспективи в изследването на генетиката на бронхиалната астма

Въпреки огромните човешки и материални ресурси, въпреки че в проучването на най-честото хронично заболяване в детската възраст, най-важната крачка тепърва предстои. Тя се състои в откриване на ефектите от генетичните вариации на молекулярно, клетъчно и патофизиологично ниво. Особено перспективно е изследването на епигенетичните механизми. Епигенетиката изучава наследствени промени в генната експресия и фенотипа, които не са причинени от промени в ДНК. Регулацията на епигенетично ниво модулира взаимодействията между гените и околната среда, които могат да доведат до развитие на бронхиална астма.¹¹ Двата основни епигенетични механизма – метилация на ДНК и хистонна модификация, действат синхронно и контролират генната експресия, като повлияват структурата на хроматина. Промени могат да възникнат не само пренатално и скоро след раждането, но и през целия жизнен цикъл, дори да се унаследяват в поколението.¹⁰ С епигенетични промени може да се обясни как пренаталната експозиция на цигарен дим води до по-висок риск от астма и защо унаследяването на някои полиморфизми от майката е свързано с по-голям риск от развитие на заболяването и повишени IgE.¹⁶ Съществено е да се отбележи, че функционалните изследвания са изключително трудни за дизайн и провеждане в лабораторни условия. На практика разработката им е все още в начална фаза, но именно те ще отговорят на въпроса как генетичните промени и факторите на околната среда водят до изява на бронхиална астма.

Литература

1. Breslow DK, Collins S, Bodenmiller B, et al. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature* 2010; 463:1048–1053.
2. Cantero-Recasens G, Fandos C, Rubio-Moscardo F, et al. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Hum Mol Genet* 2010; 19:111–121.
3. Eichler EE, Flint J, Gibson G et al. Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease. *Nat Rev Genet* 2010; 11:446–450.
4. Evans DM, Cardon LR. Guidelines for genotyping in genome-wide linkage studies: single nucleotide polymorphism maps versus microsatellite maps. *Am J Hum Genet* 2004; 75:687–692.
5. Hall IP. Genetics and pulmonary medicine: asthma. *Thorax* 1999; 54:65–69.
6. Holloway JM, Jongepier H, Beghé B, et al. The genetics of asthma. *Eur Respir Mon* 2003; 8(23):26–56.
7. Kabesch M, Tzotcheva I, Carr D, et al. A complete screening of the IL4 gene: Novel polymorphisms and their association with asthma and IgE in childhood. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:893–898.
8. Kabesch M, Hasemann K, Schickinger V, Tzotcheva I, et al. A promoter polymorphism in the CD14 gene is associated with elevated levels of soluble CD14 but not with IgE or atopic diseases. *Allergy* 2004; 59:520–525.
9. Kabesch M. Novel asthma-associated genes from genome-wide association studies: what is their significance? *Chest* 2010; 137(4):909–15.
10. Kabesch M, Michel S, Tost J. Epigenetic mechanisms and the relationship to childhood asthma. *Eur Respir J* 2010; 36:950–961.
11. Kumar RK, Hitchins MP, Foster PS. Epigenetic changes in childhood asthma. *Dis Model Mech* 2009; 2:549–553.
12. Moffatt MF, Kabesch M, Liang L, et al. Genetic variants regulating ORMDL3 expression contribute to the risk of childhood asthma. *Nature* 2007; 448:470–473.
13. Moffatt MF, Gut I, Demenais F, et al. A large-scale, consortium-based genome-wide association study of asthma. *N Engl J Med* 2010; 363:1211–1221.
14. Moussion C, Ortega N, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: a novel 'alarmin'? *PLoS ONE* 2008; 3(10):e3331.
15. Ober C, Vercelli D. Gene-environment interactions in human disease: nuisance or opportunity? *Trends Genet* 2011; 27:107–115.
16. Pfeifferle PI, Pinkenburg O, Renz H. Fetal epigenetic mechanisms and innate immunity in asthma. *Curr Allergy Asthma Rep* 2010; 10:434–443.
17. Sandford AJ, Paré PD. The genetics of asthma—the important questions. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161:5202–206.
18. Torgerson, DG., Ampleford EJ, Chiu GJ, et al. Meta-analysis of genome-wide association studies of asthma in ethnically diverse North American populations. *Nat Genet* 2011; 43(9):887–892.
19. Vercelli D. Discovering susceptibility genes for asthma and allergy. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:169–182.
20. Walsh KM, Bracken MB, Murk WK, et al. Association between reduced copy number at T-cell receptor gamma (TCR-gamma) and childhood allergic asthma: A possible role for somatic mosaicism. *Mutat Res* 2010; 690:89–94.
21. Xia J, Wang Q, Jia P et al. NGS catalog: A database of next generation sequencing studies in humans. *Hum Mutat* 2012; 33(6):E2341–55.